

CLSM-System zur Analyse von Präparaten in horizontaler und vertikaler Orientierung

Benötigt wird ein System zur konfokalen Laser Scanning Mikroskopie, dass Bildaufnahmen sowohl in horizontaler als auch vertikaler Objektorientierung erlaubt. Die vertikale Orientierungsoption muss die laterale Betrachtung von Präparaten (z.B. Keimlingswurzeln) im Zustand des natürlichen Gravistimulus (= aufrechte Probenorientierung) erlauben. In vertikaler Probenorientierung sollen primär Pflanzenwurzeln oder Keimlinge als `whole mount` Präparate analysiert werden. In horizontaler Orientierung sollen entweder im Anschluss/Wechsel dazu oder unabhängig von vertikalen Analysen Aufnahmen von Blattproben, Schnittpräparaten, `whole mount` Wurzeln und Hypokotylen, Pflanzenprotoplasten und anderen Proben erfolgen. In beiden Orientierungen muss die Analyse subzellulärer Kompartimente, Organellen und Strukturen hochauflösend realisierbar sein, wobei die zeitgleiche Detektion multipler Fluorophore möglich sein muss. Das System muss eine automatische Probendetektion, ein hochauflösendes Detektionssystem mit spektraler Entmischung und ein Spektraldetektor mit automatischer Entmischung aufweisen. Sollte ein unmittelbarer Wechsel (ohne professionellen Technikereinsatz) von horizontaler zu vertikaler Orientierung nicht in einem Tubus möglich sein, sind alternative Vorschläge zur Realisierung eines CLSM-Systems anzubieten, die eine adäquate Analyse von vertikalen und horizontalen Orientierungen der Proben gewährleistet. Dabei ist allerdings sicherzustellen, dass die jeweilige Probe (z.B. Wurzel) ortgenau (z.B. durch Koordinatenübertragung) und unmittelbar nacheinander sowohl horizontal als auch vertikal untersucht werden kann. Die vorgeschlagene Lösung des Mikroskopiesystems muss in einer kurzen Projektskizze dargestellt werden, um eine Passgenauigkeit der Anforderungen zu gewährleisten (proof-of-concept). Angebote nachweislich generalüberholter Demogeräte sind erlaubt bei voller Gewährleistung dieser über zwei Jahre.

Detaillierte Spezifikationen, die das System erfüllen muss, sind im Folgenden gelistet. Spezifikationen, die nur für horizontale oder vertikale Probenausrichtung relevant sind, sind jeweils gesondert aufgeführt.

Mikroskopstativ:

Vollmotorisiertes inverses Forschungsstativ mit folgenden Spezifikationen:

- Schrittweite Fokus mind. 10 nm
- Z-Trieb Hub mind. 13 mm

- Leistungsfähiger Hardware-Autofokus zur schnellen Fokussierung und Drift-Kompensation in Zeitreihen- und Multipositionsexperimenten
- vollmotorisierter Kondensor mit langem Arbeitsabstand mit Numerischer Apertur $\geq 0,55$ und Arbeitsabstand $\geq 26\text{mm}$, motorischer Aperturblende, motorischer Shutter, mit 7 Positionen und integrierter Multi-LED-IR-Beleuchtung zur automatisierten Proben- und Probengefäß-Erkennung mithilfe von vortrainierten Algorithmen
- Objektivrevolver motorisiert mit automatischer Objektiverkennung, 6 Positionen für Durchlicht-Hellfeld, DIC
- Durchlichtbeleuchtung
- Auflichtbeleuchtung für Fluoreszenz: 7-Kanal LED-Epifluoreszenzlichtquelle mit intensitätsstabilisierten LEDs (ca. 385, 430, 475, 511, 555, 590, 633 nm)
- Multi-Filtersätze für Epifluoreszenz: 4fach: für DAPI, GFP, RFP, Cy5 und 3-fach: CFP, YFP und mCherry oder ähnlich, einfach und schnell ohne Werkzeug austauschbar
- Auflicht Fluoreszenz-Beleuchtung mit internem Shutter, apochromatisch korrigierter Strahlengang mit hoher Transmission ($>80\%$ im Bereich 375-825 nm)
- motorisierter Filterrevolver mit mind. 6 Positionen und automatischer Filtererkennung
- Parfokalitäts- und Parzentritätsmanager
- Verfahrensgeschwindigkeit für jedes Objektiv individuell in Fokus und XY einstellbar
- Ölstopp-Manager bei Objektivwechsel für mind. Öl, Wasser und Luft
- Kameraport
- Scanningtisch mit Controller und Joystick: Fahrbereich: 130 mm x 100 mm, max. Geschwindigkeit: 50 mm/sec, Auflösung: 0,1 μm Reproduzierbarkeit: $\pm 1 \mu\text{m}$, Absolute Genauigkeit: $\pm 5 \mu\text{m}$, einstellbare Endlagenschalter inkl. Universal-Halterahmen für Multiwellschalen, Petrischale 35 und 60 mm, Objektträger und Kammern
- Z-Piezoaufsatz zur präzisen und schnellen Aufnahme von Z-Stapeln: mind. 500 μm Hub, inkl. Einlegerahmen
- Frei positionierbare Dockingstation mit Touchscreen Display zur Steuerung aller motorischen Funktionen und Fokusrad inkl. Definition nutzerspezifischer hardware-Shortcuts am Mikroskop-Bedienpanel muss soll möglich sein
- Okular 10x/23 mit Augenmuscheln
- Stage Top Inkubator: Universeller und heizbarer Halterahmen mit magnetischen, wechselbaren Haltern für Objektträger und Multigefäß-Slides, Petrischalen 3,5 und 6 cm; Halterahmen für Mikrotiterplatten; passend dazu einen beheizten Glasdeckel für CO₂/O₂ Experimente, Gasmischer-System für CO₂-Regelung inkl. Befeuchtung

- Controller für Temperierung und CO₂-Zugabe, inklusive Temperatursensor (Temperaturbereich: Umgebungstemperatur bis mindestens 42 °C, Temperaturgenauigkeit +/- 0,5 °C, Auflösung ca. 0,1°C). Kontrolle der Parameter muss über das Stativ und die Software möglich sein

In horizontaler Probenausrichtung:

- Der Scanningtisch muss hier bessere Leistungsdaten erreichen: Geschwindigkeit mind. 100 mm/sec, Auflösung ca. 0,1 µm, Reproduzierbarkeit: ca. +/- 0,6 µm. Für weiterführende Experimente muss außerdem ein großer abgedunkelter Inkubator mit integrierter (dimmbarer) Innenbeleuchtung enthalten sein, der das Mikroskopsystem umschließt und leicht zu entfernen ist

In vertikaler Probenausrichtung:

- Aufsichtbeleuchtung für Fluoreszenz: 4-Kanal LED-Epifluoreszenzlichtquelle mit intensitätsstabilisierten LEDs (ca. 385, 475, 555, 633 nm) ausreichend

Modul zur automatischen Probendetektion:

- Motorische Unterstützung zur Probenbeladung und automatische Kalibrierung des Probenträgers
- KI-gestützte Identifizierung von Probenträgertyp, Deckgläsern und Wells, sowie Probenarealen
- GUI-basiertes Feedback zur Qualität der automatischen KI-gestützten Analyse
- Integrierte Übersichtskamera zur Erstellung von Übersichtsbildern
- Composite Darkfield Contrast für probenschonende, Label-freie Aufnahmen mit hoher Sensitivität in FOV von mind. 7,5 x 5 cm, erweiterbar auf 12,5x8cm FOV
- Probenschonender, Label-freier Long-range Autofocus mit Fangbereich mind. 100 DOF des verwendeten Objektivs
- Automatisches Setup von Aufnahmearealen
- LED-basierter Kohärenzkontrast für probenschonendes, Label-freies Imaging unter Durchlichtbedingungen

Objektive:

Die folgenden Objektive müssen am System mindestens zur Verfügung stehen.

- 2,5x plan- und semiapochromatisch korrigiertes Trocken-Objektiv, mind. N.A. 0,08 für Deckgläser der Dicke 0,17 mm, Arbeitsabstand mind. 8 mm
- 5x plan- und semiapochromatisch korrigiertes Trocken-Objektiv mit N.A. 0,15 oder höher
- 10x plan- und semiapochromatisch korrigiertes Trocken-Objektiv, mind. N.A. 0,3, Arbeitsabstand mind. 5 mm
- 20x plan-apochromatisch korrigiertes Trocken-Objektiv, mind. N.A. 0,8, Arbeitsabstand \geq 550 μ m
- *25x, (Langer Arbeitsabstand) plan- und apochromatisch korrigiertes Objektiv mit Korrekturring und Multi-Immersion Wasser/Glycerin/Silikon/Öl, mind. N.A. 0,8 oder mehr sowie einem Arbeitsabstand von mind. 570 μ m
- *40x C-Apochromat mit Korrekturring zum Ausgleich von Deckglasschwankungen und Wasserimmersion, N.A. 1,2 oder höher, Selektiert für FCS-Anwendungen
- *63x plan- und apochromatisch korrigiertes Objektiv, Öl-Immersion, mind. N.A. 1,4 oder höher sowie einem Arbeitsabstand von mind. 190 μ m
- Für die Objektive 20x, 25x, 40x und 64x muss eine DIC Ausrüstung mitgeliefert werden

* die so gekennzeichneten Objektive müssen eine hohe optische Güte (Definitionshelligkeit höher 90%) aufweisen, um für Applikationen im Superresolution-Modus verwendet werden zu können

Kamera:

Zur Aufnahme von Weitfeldfluoreszenzbildern wird eine in Hard- und Software integrierte Monochrome CMOS Mikroskopkamera inkl. Adapter benötigt.

- mind. 5 MPx: Pixelgröße max. 3,45 μ m x 3,45 μ m
- Sensordiagonale 2/3“ oder größer
- Global-Shutter
- Sensorbereich (ROI): frei definierbar
- Kühlung: Lüfterlose geregelte Peltier-Kühlung, Temperaturstabilisierung auf 25°C

Laser Scanning Modul:

- Zwei unabhängige Galvoscaner mit 85% Duty-Cycle und max. 15 % Rückschwingzeit
- Scanner müssen lineares Scanverhalten bei gleichbleibender Pixel-Dwell-Zeit bei allen Aufnahme-Modi aufweisen, um eine quantifizierbare Analyse der Daten zu ermöglichen
- Als Scan Modi müssen Bild-für-Bild, Linie-für-Linie oder feste Position (spot) möglich sein
- Auflösung dabei mind. bis zu 6144x6144 Pixel (Vollbild) bis zu 32x1 (Spot) frei einstellbar
- Scangeschwindigkeit von mind. 8 Bilder/Sekunde bei 512x512
- Hardware-basierter Scanning Zoom mit 0,6-40x einstellbar in 0,1 Schritten
- Scanfeld mind. 20 mm diagonal bei voller Ausleuchtung der Pupille im Zwischenbild
- Um 10 Grad gekippter Hauptfarbteiler mit hervorragender Laserunterdrückung ($OD > 6$)
- Pinhole muss apochromatisch korrigiert und in seiner Größe frei einstellbar von 0,0 bis 8 AU sein
- Detektionsbänder müssen ohne spezifische Emissionsfilter oder Nebenfarbteiler frei einstellbar sein. Es muss möglich sein, auch direkt über die Anregungslinie des Lasers zu detektieren, ohne dessen Signal in der Aufnahme zu sehen
- Externer PMT für simultane Durchlicht-Detektion
- Frei um 360 Grad rotierbares Scanfeld

In horizontaler Probenausrichtung:

- Die Scaneinheit muss hier bessere Leistungsdaten erreichen: Scangeschwindigkeit von 13 Bilder/Sekunde bei 512x512, 6830 Linien/Sekunde bei 512x1, bzw. Spotscan mit Dwell-Zeit von 1,23 μ sec, Auflösung dabei bis zu 8190x8190 Pixel (Vollbild) bis zu 32x1 (Spot) frei einstellbar (am besten in diesem Modus aktiv gekühlt und temperaturkontrolliert)
- Ein 80/20-Strahlteiler für Reflexionsmodus muss hier ansteuerbar sein
- Photon Counting-Modus muss möglich sein

Laser Scanning Mikroskop - spektrale Aufnahme:

- Spektren müssen in einer Datenbank abspeicherbar und wiederverwendbar sein
- Automatische Extraktion von Komponenten durch Anwählen von einzelnen Bildpunkten
- Möglichkeit der Verrechnung der Aufnahme mit zuvor abgespeicherten Referenzspektren in allen Aufnahmemodi

In horizontaler Probenausrichtung:

- Spektralauflösung von unter 10 nm mittels Gitter zur Spektralen Entmischung auf 32x-GaAsP-Spektral-Array mit einer einzigen Belichtung (ca. 300 nm spektrale Bandbreite müssen mit einem Scan abgedeckt werden können)
- Mind. 32-Kanal-Detektor auf Basis von GaAsP-PMT in Kombination mit zwei flankierenden PMTs für höhere Sensitivität im unteren und oberen Spektralbereich und untereinander Kalibriert
- Parallele Aufzeichnung und spektrale Trennung von mind. 12 verschiedenen Fluorophoren zeitgleich
- Schnelle, parallele Erfassung des gesamten Spektralbereichs als Stapel (380 - 750/900 nm) in einem einzigen Scan (bis zu 5 Bilder pro Sekunde bei 512 x 512 Pixeln)
- Zwei NIR-Detektoren zur Detektion bis 900 nm, welche vollständig in die spektrale Aufnahme und Entmischung integriert sind
- Lineare Auftrennung des emittierten Lichtes mittels eines holografischen Gitters
- Steigerung der Detektionseffizienz durch Rückführung von nicht aufgetrenntem Signal in den Strahlengang
- Lichtweg zu allen Detektoren ohne Kaskade
- Verlässliche Trennung von Fluorophoren mit stark überlappenden Spektren aufgrund vorangegangener Aufnahmen und Erstellung von Referenzspektren in Echtzeit

In vertikaler Probenausrichtung:

- Spektralauflösung von 1 nm zur spektralen Entmischung z.B. durch variable Beamsplitter
- mind. 3-Kanal-Detektor auf Basis von GaAsP-PMT, vergleichbares Signal der Detektoren zur Erstellung eines spektralen Datensatzes durch simultane Aufnahme untereinander kalibriert
- Scan Modus zur Erstellung spektraler Datensätze
- Verlässliche Trennung von Fluorophoren mit stark überlappenden Spektren aufgrund vorangegangener Aufnahmen und Erstellung von Referenzspektren

Laser Scanning Mikroskop - Superauflösung:

- Möglichkeit der Erstellung von Aufnahmen mit Superauflösung mittels eines konfokalen Flächendetektors auf GaAsP-PMT Basis mit mind. 32 Detektorelementen
- Folgende Parameter der Aufnahmen müssen erreicht werden: Auflösung in XY bis 120 nm, in axialer Richtung bis 350 nm oder besser, bei gleichzeitiger Lichtausbeute von mind. 1,25 AU (Pinhole muss mind. auf 1,25 AU während der gesamten Aufnahme geöffnet sein). Nutzung von Emissionslicht entsprechend 1,25 AU-Pinhole-Durchmesser zur Bildentstehung
- Quanteneffizienz ca. 45% oder höher
- Auflösungsverbesserung um mind. den Faktor 2 (bei Verwendung des 63x Objektivs)
- Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses gegenüber klassischer konfokaler Detektion um den Faktor 4 bis 8
- Signifikant reduzierter Lasereintrag in die Probe z.B. durch Parallelisierung (<1/8 der bei klassischer Anregung notwendigen Laseranregung)
- Softwaremodul basierend auf Joint Iterativen Methoden zur Auflösungssteigerung: bis 90 nm oder besser in XY-Richtung und bis 200 nm oder besser in axialer Richtung, anhand der Rohdaten aufgenommen im Superauflösungsmodus des konfokalen Flächendetektors; bis 120 nm oder besser in XY-Richtung und bis 250 nm oder besser in axialer Richtung anhand der Rohdaten aufgenommen im Parallelisierungsmodus des konfokalen Flächendetektors
- Geschwindigkeit von mind. 18 Bildern pro Sekunde bei 512x512 Pixeln und Auflösung von mindestens 140 nm oder besser, in XY-Richtung bis 450 nm. Pixel-Dwelltime muss dabei unverändert hoch sein (mindestens 0,67 μ s), z.B. durch Detektion mehrerer paralleler Linienzeilen durch Parallelisierung des Auslesevorganges. Pinhole muss mind. auf 1,25 AU während der gesamten Aufnahme geöffnet sein. Nutzung von Emissionslicht entsprechend 1,25 AU-Pinhole-Durchmesser zur Bildentstehung.

In horizontaler Probenausrichtung:

- Im Superauflösungsmodus müssen hier bessere Leistungsdaten erreicht werden: mind. 60 Bilder pro Sekunde bei 576x452 Pixel und Auflösung von mindestens 160 nm oder besser in XY-Richtung sind zu erreichen. Pixel-Dwelltime muss dabei unverändert hoch sein (mindestens 0,3 μ s). Pinhole muss mind. auf 1,25 AU während der gesamten Aufnahme geöffnet sein. Nutzung von Emissionslicht entsprechend 1,25 AU-Pinhole-Durchmesser zur Bildentstehung.

Laser Scanning Mikroskop - Lasermodul:

- Lasermodul mit folgenden Dioden- oder DPSS-Lasern: 405 nm, 488 nm, 561 nm, 639 nm
- Laserleistung für das Scanmodul muss direkt moduliert werden
- Laser müssen im Feld austauschbar / nachrüstbar sein
- Laser müssen leistungsreguliert für stabile und reproduzierbare Ausgabeleistung sein
- Laserlinien müssen gleichzeitig modulierbar sein
- Lasersicherheitseinrichtung zum Schutz der Augen des Nutzers

In horizontaler Probenausrichtung:

- zusätzliche Dioden- oder DPSS-Laser müssen hier verfügbar sein: bei ca. 445 nm, 514 nm, 730 nm

Steuer-Computer:

- Leistungsstarke Workstation auf Basis Windows 11 - 64 bit (alternativ Windows 10 LTSC LOT - 64 bit, Updates garantiert bis 2032)
- Prozessor: mind. Xeon: mind. 8 Kerne
- SSD: mind. 512 GB
- Festplattenkapazität von mind. 6 TB als RAID1
- Optisches Laufwerk: DVD +/-RW Recorder
- Mind. 128 GB RAM
- Netzwerkadapter 2x10 GbE RJ45
- CUDA-Grafikkarte mit mind. 8 GB RAM
- Monitor mind. 32 Zoll
- Echtzeit-Elektronik Ausrüstung

Auswertungsrechner:

- Leistungsstarke Workstation auf Basis Windows 11 - 64 bit (alternativ Windows 10 LTSC LOT - 64 bit, Updates garantiert bis 2032)
- Processor: mind. Xeon: mind. 8 Kerne
- SSD: mind. 512GB
- Festplattenkapazität von mind. 6 TB als RAID1
- Optisches Laufwerk: DVD +/-RW Recorder

- Mind. 128 GB RAM
- Netzwerkadapter 2x10 GbE RJ45
- CUDA-Grafikkarte mit mind. 8 GB RAM
- Monitor mind. 32 Zoll

Software:

- Steuersoftware zur Bildaufnahme mit allen erforderlichen Modulen zur Erstellung von Bilddaten über X-, Y-, Z-Positionen, Z-Stapel, Zeitpunkte, Fluoreszenz- und Durchlicht-Kanäle, Kachelaufnahmen
- Multilayer-Dateiformat für X-, Y-, Z-Positionen, Z-Stapel, Zeitpunkte, Fluoreszenz- und Durchlicht-Kanäle, Kachelaufnahmen inkl. Stitching sowie Speicherung aller System-spezifischen Parameter wie z.B. Laser-Intensität, Auflösung, Scangeschwindigkeit, Strahlengang-Konfiguration, Inkubation
- Grundfunktionalität zur Auswertung von dynamischen und FRAP-Experimenten und zur Berechnung von Kollokalisierung von Signalen
- Reuse-Funktion zum Laden aller Experimentdaten anhand des Bildes
- Modul zur Konfiguration inhomogener Aufnahmeexperimente: Zeitserie, Multizeitserie, Z-Stapel, Kachelbilder/ Multipositionsbilder und Kanäle in beliebiger Abfolge
- Modul zur geführten Aufnahme zur automatischen Aufnahme von Objekten von Interesse (z. B. für seltene Ereignisse) mit den Schritten Aufnahme eines Übersichtsbildes der Probe, automatische 2D-Bildanalyse zur Erkennung von Objekten, Aufnahme von Detailbildern für die erkannten Objekte.
- Modul zur Aufnahme von Z-Bildstapeln mit Hilfe eines motorisierten Fokus-Antriebs. Definition des Z-Bildstapels mit Start/Stop und Mittelpunkt. Minimal einstellbare Schrittweite von 10 nm; Schaltfläche zur automatischen Einstellung der korrekten Schrittweite zur Erfüllung des Nyquist-Kriteriums; grafische Darstellung des Z-Stapels und dynamische Darstellung während der Experiment-Ausführung
- Modul zur Aufnahme von Zeitserien: Definition der Abstände, Gesamtdauer oder Anzahl der Zyklen.
- Modul zur Berechnung von Bildern ohne Begrenzung der Tiefenschärfe aus bereits erfassten Z-Stapeln. Extraktion der scharfen Details aus Einzelbildern mit Wavelet-Algorithmus.
- Modul zur Bestimmung der optimalen Fokusposition des Präparates in Durchlicht, Auflicht und Auflicht-Fluoreszenz; Definition einer Autofokus-Region im Kamera-Bild.

- Modul zur Verbesserung von 3D-Bildstapeln durch 3D-Dekonvolutions-Algorithmen ohne Benutzer-Interaktion; primäre Dekonvolutionsmethoden: „Nearest Neighbor“, „Regularisierter inverser Filter“, „Iterativ Schnell“
- Modul um Bilddaten in einem 3D-Datenraum zu korrelieren und die Daten gleichzeitig als Projektordner abzulegen
- Multi-Image Funktion, mit der es möglich ist, bis zu 16 mehrdimensionale Bilder synchron miteinander zu vergleichen.
- Modul für erweiterte Positions- und Kachelaufnahmen vordefinierter Präparatbereiche inkl. standardisierter Probenräger sowie Aufnahme von Bildern mit Hilfe von Positionslisten; Unterstützung von Fokuskorrekturkarten, Stitching und Shadingkorrektur. Kompatibilität mit Software- und Hardware-Autofokus muss gegeben sein.
- 2D- und 3D-Bildanalysetools: Assistent zur Erstellung eines automatischen Messprogramms; Segmentierung, Objektrennung und Masken; geometrische und Intensitäts-Messungen; Anzeige in Tabellen-, Listenform und Scatterplot/Histogramm; hierarchisches Messen und Zone-of-Influence (ZOI) Messungen; Stapelverarbeitungsfunktionen zum Erzeugen von kumulierten Datenlisten oder Bildern mit eingebetteten Messdaten. Das Modul muss AI-ready sein, d.h. zuvor trainierte KI-Modelle müssen im Analyseprogramm verwendet werden können, ohne eine weitere Lizenz zu benötigen.
- FCS-Modul zur Bildaufnahme im Zählmodus für GaAsP-Detektoren, welches die Erfassung von Fluoreszenzkorrelationsspektroskopiedaten (FCS) mit einem Kanal (Autokorrelation) inkl. Fit-Modell ermöglicht
- Modul für die quantitative Analyse der Kolokalisation innerhalb von zwei Kanälen bei Mehrkanalfluoreszenzbildern mit Hilfe eines Scatterplots. Koeffizienten z.B. Pearsons, Manders; Maskenfunktion
- Möglichkeit der Verarbeitung der aufgenommenen Mikroskopiedaten in Echtzeit
- Modul für erweiterte interaktive Messungen: Messung morphologischer Parameter interaktiv definierter Konturen: Fläche, Orientierungswinkel, ...

Weiteres:

- luftgedämpfter, niveauregulierter Systemtisch mind. 900x750 mm, lange und kurze Seite offen mit Breadboard
- Installation, Einweisung und Inbetriebnahme
- Schulung, Training, Support: Vor-Ort-Training der Hard- und Software mind. ein Tag und Wiederholung nach ca. 14 Tagen oder nach Aufforderung; Applikativer Support vor Ort und Support über eine Servicehotline auch zu Applikationsspezialisten

Zusatz:

- Es muss für den Anwender möglich sein, mit einem Kalibriertool selbstständig eine automatisierte Kalibrierung von Scannerlinearisierung, Pinhole und Kollimator für das Konfokale Laser Scanning Mikroskop durchzuführen. Die Kalibrierung muss dabei mittels softwaregestützter Routine durch den Anwender im Routinebetrieb durchgeführt werden können.